



# 新型冠状病毒肺炎之 实验室检测技术

贵州医科大学公共卫生学院

誠於己 忠於羣 敬於恩



## 国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案（第四版）的通知

国卫办疾控函〔2020〕109号

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团卫生健康委，中国疾病预防控制中心：

为进一步指导各地做好新型冠状病毒肺炎防控工作，我委组织更新了新型冠状病毒肺炎防控方案。现印发给你们，请参照执行。各地在执行过程中如有相关建议，请及时反馈我委。

附件：新型冠状病毒肺炎防控方案（第四版）

国家卫生健康委办公厅

2020年2月6日

（信息公开形式：主动公开）

### 新型冠状病毒肺炎防控方案

（第四版）

新型冠状病毒属于β属的冠状病毒，基因特征与 SARSr-CoV 和 MERSr-CoV 有明显区别。病毒对紫外线和热敏感，56℃ 30 分钟、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒。基于目前证据，潜伏期为1-14天，多为3-7天；无症状感染者也可能成为飞沫和接触传播，气溶胶和粪口传播。

为做好全国新型冠状病毒肺炎疫情防控相关机构的培训，到“早发现、早报告、早诊断、早治疗”，降低病死率，切实维护社会稳定，根据新型冠状病毒肺炎诊疗方案、全国疫情形势变化和病原学检测方案的基础上更新本方案。

#### 一、目的

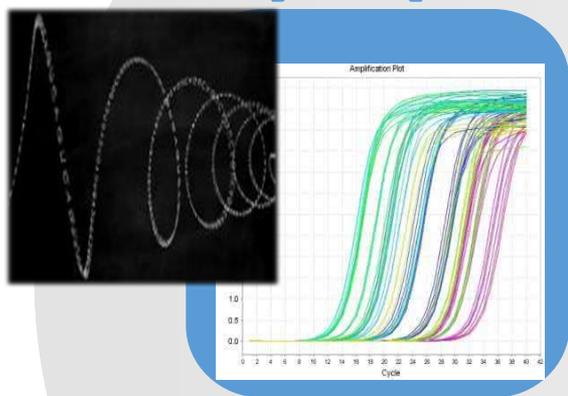
及时发现和报告新型冠

#### （四）标本采集与检测。

收治病例的医疗机构要采集病例的相关临床标本，尽快将标本送至当地指定的疾控机构或医疗机构或第三方检测机构实验室进行相关病原检测（实验室检测技术指南见附件4）。

采集的临床标本包括病人的上呼吸道标本（如咽拭子、鼻拭子等）、下呼吸道标本（如呼吸道吸取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、深咳痰液等）、眼结膜拭子、粪便标本、抗凝血和血清标本等。临床标本应当尽量采集病例发病早期的呼吸道标本（尤其是下呼吸道标本）和发病7天内急性期血清以及发病后第3~4周的恢复期血清。

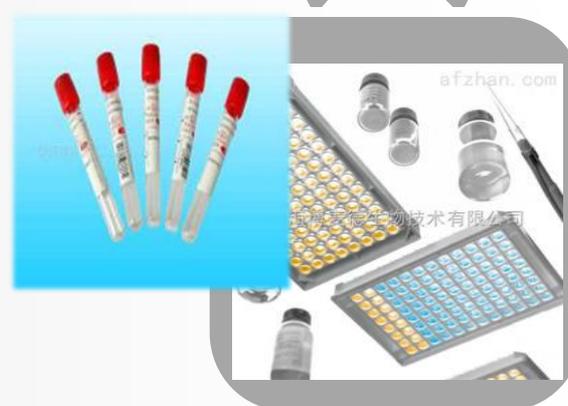
标本采集、运送、存储和检测暂按二类高致病性病原微生物管理，按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》及《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（卫生部令第45号）及其他相关要求执行。



**核酸检测**  
(快速敏感)



**病毒分离**  
(金标准)



**血清学检测**

**主要介绍目前已经比较成熟、易于实施的核酸检测方法**

新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南（第四版）

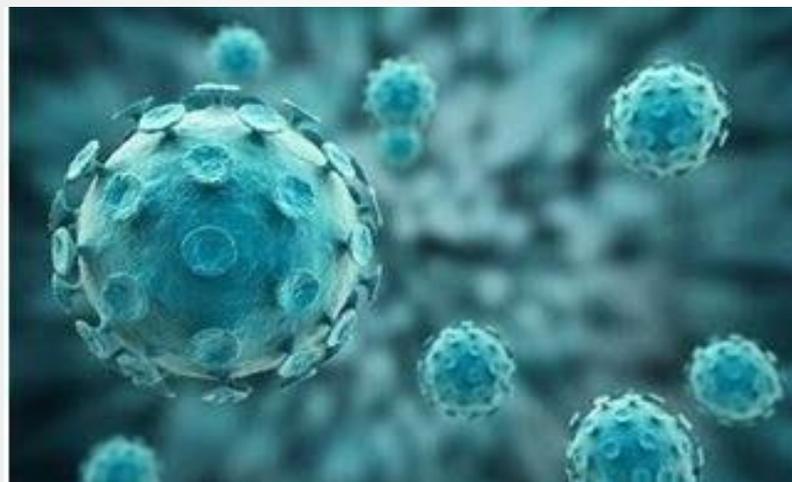
- ❖ 潜伏期 **1-14** 天，多为 **3-7** 天，患者有传染性，无症状感染者也可能有传染性
- ❖ 若传染周期定为 **3-7** 天（多数潜伏期），如果能在发病 **7** 天内确诊病人，则可能将疫情有效控制在 **2** 代病人以内



## 一、标本采集

## 二、实时荧光RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸

## 三、病原生物安全实验活动要求



# 一、标本采集

## (一) 采集对象

- ❖ 新型冠状病毒肺炎疑似病例、临床诊断病例（仅限湖北省）和聚集性病例，其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者，或其他需要进一步筛查检测的环境或生物材料（如溯源分析）。



## （二）标本采集要求

- ❖ 技术人员应经过**生物安全培训**（培训合格）和具备相应的实验技能。
- ❖ 采样个人防护装备（personal protective equipment, PPE）：  
**N95及以上防护口罩、护目镜、连体防护服、双层乳胶手套、防水靴套**；如果接触了患者血液、体液、分泌物或排泄物，应及时更换外层乳胶手套。



- ❖ 住院病例的标本由所在医院的医护人员采集。
- ❖ 密切接触者标本由当地指定的疾控机构、医疗机构负责采集。
- ❖ 根据实验室检测工作的需要，可结合病程多次采样。



### （三）标本采集种类及采集方法

- ❖ 每个病例必须采集急性期呼吸道标本（包括上、下呼吸道标本）。
- ❖ 重症病例优先采集下呼吸道标本（如支气管或肺泡灌洗液等）。
- ❖ 出现眼部感染症状的病例，需采集眼结膜拭子标本。
- ❖ 出现腹泻症状的病例，需留取粪便标本。
- ❖ 根据临床表现与采样时间间隔进行采集。
- ❖ 其他研究材料依据设计需求采集。



## 1. 上呼吸道标本：咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物等。

- 咽拭子：用2根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子同时擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子头浸入含3ml病毒保存液管中，尾部弃去，旋紧管盖。
- 鼻拭子：将1根聚丙烯纤维头的塑料杆拭子轻轻插入鼻道内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。另一根拭子以同样方法采集另一侧鼻孔。上述两根拭子浸入同一含3ml采样液的管中，尾部弃去，旋紧管盖。
- 鼻咽抽取物或呼吸道抽取物：用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取粘液或从气管抽取呼吸道分泌物。将收集器头部插入鼻腔或气管，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出，收集抽取的粘液，并用3ml采样液冲洗收集器1次。



## 2. 下呼吸道标本：深咳痰液、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本。

- 深咳痰液：病人深咳后，将咳出的痰液收集于含3ml采样液的50ml螺口塑料管中。
- 支气管灌洗液：将收集器头部从鼻孔或气管插口处插入气管（约30cm深处），注入5ml生理盐水，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出。收集抽取的粘液，并用采样液冲洗收集器1次。
- 肺泡灌洗液：局部麻醉后将纤维支气管镜通过口或鼻经过咽部插入右肺中叶或左肺舌段的支管，将其顶端契入支气管分支开口，经气管活检孔缓缓加入灭菌生理盐水，每次30~50 ml，总量100~250ml，不应超过300ml。



### 3. 血液标本：尽量采集发病后**7天内**的急性期抗凝血。

- 使用含有EDTA抗凝剂的真空采血管采集空腹血5ml，室温静置30分钟，1500~2000rpm离心10分钟，分别收集血浆和血液中细胞于无菌螺口塑料管中。

### 4. 血清标本：血清标本主要用于抗体的测定，确认病例的感染状况。尽量采集急性期、恢复期双份血清。**第一份**血清最好在发病后**7天内**采集，**第二份**血清应在发病后第**3~4周**采集。

- 用无抗凝剂的真空采血管采血5ml，室温静置30分钟，1500~2000rpm离心10分钟，收集血清于无菌螺口塑料管中。



**5. 眼结膜标本：**出现眼部感染症状的病例需采集眼结膜拭子标本。

➤ 眼结膜表面用拭子轻轻擦拭后，将拭子头进入采样管中，尾部弃去，悬紧管盖。

**6. 粪便标本：**如患者发病早期出现腹泻症状，则留取粪便标本3-5ml。

**7. 其他材料：**依据设计需求规范采集。



## （四）标本包装

**标本采集后在生物安全二级实验室生物安全柜内分装。**

- **所有标本应放在大小适合的带螺旋盖内有垫圈、耐冷冻的样本采集管里，拧紧。容器外注明样本编号、种类、姓名及采样日期。**
- **将密闭后的标本放入大小合适的塑料袋内密封，每袋装一份标本。样本包装要求要符合《危险品航空安全运输技术细则》相应的标准。**
- **涉及外部标本运输的，应根据标本类型，按照A类或B类感染性物质进行三层包装。**



## （五）标本保存

- ❖ 用于病毒分离和核酸检测的标本应尽快进行检测，能在24小时内检测的标本可置于4℃保存；24小时内无法检测的标本则应置于-70℃或以下保存（如无-70℃保存条件，则于-20℃冰箱暂存）。
- ❖ 血清可在4℃存放3天，-20℃以下可长期保存。
- ❖ 应设立专库或专柜单独保存标本。
- ❖ 标本运送期间应避免反复冻融。



## (六) 标本送检

❖ 标本采集后应尽快送往实验室，如需要长途运输标本，应采用干冰等制冷方式进行保藏。

1. 上送标本：各省/自治区/直辖市聚集性病例的标本送中国CDC病毒病预防控制所进行检测复核，并附样本送检单（见附件）。

附表

新型冠状病毒检测标本送检表

送样单位(盖章): \_\_\_\_\_ 送样日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

送样人: \_\_\_\_\_

标本 编号	标本类型	姓名	性别	年龄	发病日期	就诊日期	采样日期	样本来源是否 为聚集性病例 §	检测日期	实时荧光 RT-PCR		基因序列同源性*		备注
										试剂厂家	靶基因	一代	深度测序	

基因序列同源性\*非必选项，注明完成具体靶基因序列/全基因组序列，及其与新型冠状病毒的同源性。样本来源是否为聚集性病例§填是或否。

## 2. 病原体及标本运输。

**2.1 国内运输：新型冠状病毒毒株或其他潜在感染性生物材料的运输包装分类属于A类，对应的联合国编号为UN2814，包装符合《危险品航空安全运输技术细则》要求；环境样本属于B类，对应的联合国编号为UN3373，包装符合《危险品航空安全运输技术细则》要求；通过其他交通工具运输的可参照以上标准包装。新型冠状病毒毒株或其他潜在感染性材料运输应按照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（原卫生部令第45号）办理《准运证书》。**



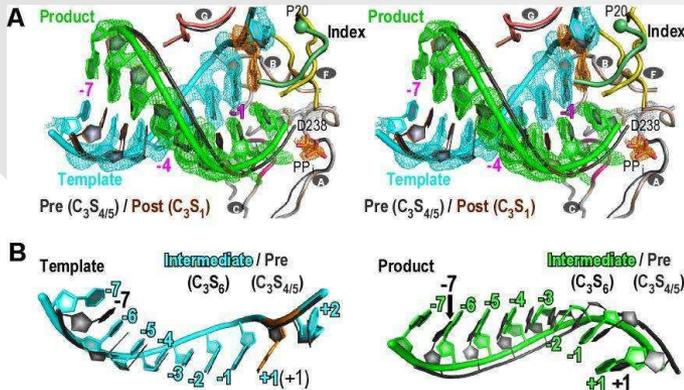
**2.2 国际运输：新型冠状病毒毒株或样本在国际间运输的，应规范包装并按照《出入境特殊物品卫生检疫管理规定》办理相关手续，并满足相关国家和国际相关要求。**

**2.3 毒株和样本管理：新型冠状病毒毒株及其样本应由专人管理，准确记录毒株和样本的来源、种类、数量，编号登记，采取有效措施确保毒株和样本的安全，严防发生无用、恶意使用、被盗、被抢、丢失、泄露等事件。**



# 二、实时荧光RT-PCR方法检测新型冠状病毒核酸

- ❖ 新型冠状病毒的常规检测方法是实时荧光RT-PCR
- ❖ 检测必须在具备适当条件的实验室并由经过相关技术安全培训的人员进行操作
- ❖ 本方法主要针对新型冠状病毒基因组中开放读码框1ab ( open reading frame 1ab , **ORF1ab** ) 和核壳蛋白 ( nucleocapsid protein , **N** )



## 1. 样本收集



## 3. 核酸提取



样本采集后及时送检

待检样本存放于-70°C冰箱保存

ORF1ab/N 检测

ORF1ab/E/N 检测

其他鉴别诊断检测

- 核对被检样本姓名、性别、年龄、编号及检测项目等
- 待检样本的状态如有异常，需注明

## 2. 实验室送检

## 4. 核酸扩增检测

# 核酸提取流程-自动提取仪



标本灭活在生物  
安全柜中完成

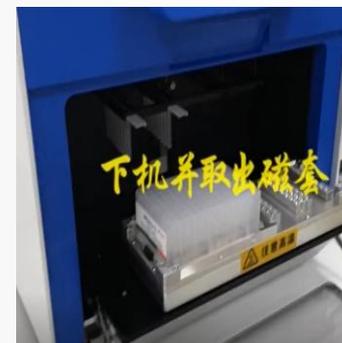
加样本



放入磁套和试剂



点击“开始”  
运行



运行结束后，下机  
取出磁套和试剂

## ❖ 新型冠状病毒ORF1ab、N基因区域引物和探针

### ➤ 靶标一（ORF1ab）：

✓ 正向引物（F）：CCCTGTGGGTTTTACTTAA

✓ 反向引物（R）：ACGATTGTGCATCAGCTGA

✓ 荧光探针（P）：5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3'

### ➤ 靶标二（N）：

✓ 正向引物（F）：GGGGAAGTTCTCCTGCTAGAAT

✓ 反向引物（R）：CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG

✓ 荧光探针（P）：5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'

### ➤ 核酸提取和实时荧光RT-PCR反应体系及反应条件参考相关厂家试剂盒说明

- ❖ 在已加入反应体系20ulmix的PCR反应管/板上分别加入：
  - ① 处理好的待检标本核酸5ul
  - ② 阴性对照、阳性对照各5μL
- ❖ 盖紧管盖或封膜，瞬间低速离心后置荧光PCR检测仪扩增
  - ① 设置扩增程序，分析报告结果

## ORF1ab/N基因（双重）

步骤	温度	时间	循环数
① 逆转录	50℃	10min	1cycle
② 预变性	95℃	5min	1cycle
③ 变性	95℃	10s	40cycles
退火/延伸/检测荧光*	55℃	40s	

\* 步骤③中55℃时荧光检测，检测通道为FAM、HEX/VIC

\* ABI系列荧光PCR仪不选ROX校正，淬灭基团选None

# 新型冠状病毒核酸检测结果判断

- ❖ 阴性：无 Ct 值或  $Ct \geq 40$ 。
- ❖ 阳性：Ct 值  $< 37$ ，可报告为阳性。
- ❖ 灰度区：Ct 值在37-40之间，建议重复实验，若重做结果 Ct 值  $< 40$ ，扩增曲线有明显起峰，该样本判断为阳性，否则为阴性。

## 质量控制

- 阴性对照：Ct值  $> 40$  或未检出。
- 阳性对照：扩增曲线呈S型，且Ct值  $\leq 30$ 。
- 同一实验以上要求需同时满足，否则本次实验视为无效。
- 实验需设阴阳对照，不同的靶标根据对应阴性调整基线阈值

注：如果用商品化试剂盒，以厂家提供的说明书为准。

## ❖ 确认一个病例为阳性，满足以下条件：

- 同一份标本中新型冠状病毒 **2个靶标（ORF1ab、N）** 特异性实时荧光RT-PCR检测结果**均为阳性**。
- 如果出现**单个靶标阳性**的检测结果，则需要**重新采样，重新检测**。



- 样本质量差（比如口咽等部位的呼吸道样本）
- 样本收集的过早或者过晚
- 没有正确的保存、运输和处理样本
- 技术本身存在的问题（如病毒变异、PCR抑制等）

阴性结果不能  
排除感染

RT-PCR结果阴性，临床/流行病学提示感染

- 可采用血清学方法进行检测
- 双份血清标本能够满足血清学检测的要求
- 但目前尚无特异敏感血清学检测技术

疑似病例连续两次呼吸道病原核酸检测阴性  
（采样时间至少间隔1天），方可排除

# 核酸扩增检测-不明肺炎患者检测项目选择



贵州医科大学  
公共卫生学院

注：鉴别诊断

伯杰Cat.No: YZ-HX-903  
(甲型流感病毒、乙型流感病毒、肠道病毒、副流感病毒 I 型/II 型/III 型/IV 型、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒、呼吸道合胞病毒、人鼻病毒、人博卡病毒、**人冠状病毒通用型**<覆盖包括2019新型冠状病毒等7种人冠状病毒>、肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、A组链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌)  
伯杰A+B荧光PCR试剂 3分钟加样 轻松做22种病原检测

单病原靶标  
**阳性**

建议至少2个品牌试剂对阳性病原体进行复核

病原通用型靶标  
**阳性**

选用伯杰单重或多重试剂盒分型

举例  
人冠状病毒通用型 **阳性**  
使用以下试剂分型：  
2019年新型冠状病毒  
MERS-CoV  
SARS-CoV  
CoV-229E  
HCoV-OC43  
HCoV-NL63  
HCoV-HKU1

所有靶标全部  
**阴性**

建议使用其他非常见呼吸道病原体试剂进行检测  
或  
宏基因组测序

# 四、病原生物安全实验活动要求

❖ 新型冠状病毒目前暂按病原微生物危害程度分类中第二类病原微生物进行管理，具体要求如下：

## （一）病毒培养

- 指病毒的分离、培养、滴定、中和试验、活病毒及其蛋白纯化、病毒冻干以及产生活病毒的重组实验等操作。在生物安全三级实验室的生物安全柜内进行。
- 实验室应报经国家卫生健康委批准，取得开展相应活动的资质。



## (二) 动物感染实验

- 指以活病毒感染动物、感染动物取样、感染性样本处理和检测、感染动物特殊检查、感染动物排泄物处理等实验操作。应在生物安全三级实验室的生物安全柜内操作。
- 实验室应当报经国家卫生健康委批准，取得开展相应活动的资质。



### （三）未经培养的感染性材料的操作

- 指未经培养的感染性材料在采用可靠的方法灭活前进行的病毒抗原检测、血清学检测、核酸提取、生化分析，以及临床样本的灭活等操作。应在生物安全二级实验室进行，同时采用生物安全三级实验室的个人防护。



### （四）灭活材料的操作

- 感染性材料或活病毒在采用可靠的方法灭活后进行的核酸检测、抗原检测、血清学检测、生化分析等操作。应在生物安全二级实验室进行。
- 分子克隆等不含致病性活病毒的其他操作可在生物安全一级实验室进行。

1. 国家卫生健康委员会. 2020.国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒感染的肺炎防控方案（第四版）的通知[EB/OL].2020.  
[http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/07/content\\_5475813.htm](http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/07/content_5475813.htm).
2. 中华人民共和国国务院令 第424号.2008.病原微生物实验室生物安全管理条例.[EB/OL].2008.[http://www.gov.cn/zhengce/content/2008-03/28/content\\_6264.htm](http://www.gov.cn/zhengce/content/2008-03/28/content_6264.htm).
3. 中华人民共和国国务院令 第698号.2018.国务院关于修改和废止部分行政法规的决定.[EB/OL].2018.[http://www.gov.cn/zhengce/content/2018-04/04/content\\_5279815.htm](http://www.gov.cn/zhengce/content/2018-04/04/content_5279815.htm).
4. 中华人民共和国卫生部令 第45号. 2005可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定.[EB/OL].2005.[http://www.gov.cn/gongbao/content/2006/content\\_453197.htm](http://www.gov.cn/gongbao/content/2006/content_453197.htm)

**注：本文部分图片来自网络，如有侵权，请联系删除。**



貴州醫科大學  
公共衛生學院



**众志成城 共克时艰!**

誠於己 忠於羣 敬於思